

心肌肽素、其制备方法及其应用

技术领域

5 本发明涉及一种心肌肽素、其制备方法及其用途，具体地说，本发明涉及从除人类以外的健康哺乳动物的心脏中提取的一种心肌肽素、其制备方法及其用途，属于生化技术领域。

背景技术

10 “心肌保护”近年来一直是心脏内、外科研究的热点。最近资料表明，缺血缺氧的心肌细胞内发生许多变化，包括细胞内钙超载，自由基产生，膜损害，ATP(adenosine triphosphate, ATP)水平下降，氧耗竭等。

心脏外科手术的日臻完善及普及，为众多患者解除了痛苦，提高了人们的生活质量。随着人们对心肌保护要求的不断提高，基础与临床研究也越来越深入。临床心脏外科的心肌保护包括：术前、术中及术后心肌保护，但心肌保护的重点仍集中在体外循环过程中预防心肌的缺血再灌注损伤方面。对此，基础与临床的科学工作者进行了深入的多方位的研究，主要包括：(1)心脏灌注：主要集中在灌注的方式，例如：顺灌、逆灌、同时灌、间断或是持续灌，是否加用血细胞过滤器等。(2)灌注液的温度：主要有常温、低温等。(3)灌注液的组份：如加用氧自由基清除剂(超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽，抑肽酶、葛根素等)。以上这些措施都在一定程度上改善了心肌缺血一再灌注损伤的病理改变。国外亦有将磷酸激酶(护心通，意大利欧辉药厂)置于灌注液中或服用曲美他嗪(万爽力，法国施维雅药厂)而使心肌在病理条件下改善代谢，从细胞、亚细胞结构、氧自由基、能量代谢、钙离子(Ca^{2+})超负荷等方面阐述了某些研究发现。但是这些研究或把重点孤立地放在补充能量方面，或是把预防损伤与机体自身的防御机制脱离开来，从而导致了心肌保护的临床效果不尽人意，因此，研究开发更有效的药物保护心肌是十分必要的。

20 为了干预心肌缺血及保护心肌，近20年来研究了许多药物，如 β -受体阻滞剂，钙拮抗剂，转换酶抑制剂，各种氧自由基清除剂等，但其对心肌的保护效果临床尚不肯定。现有治疗心肌缺血的药物，还没有一种能绝对减少心肌梗死，对抗心肌缺血。八十年代后期，人们观察到果蝇幼虫经短期高热处理，其唾液腺细胞多丝染色体“膨松”方式发生改变，显示这一区域基因转录被激活，并称此为热休克效应(heat shock reaction, HSR, Anna Rev Biochem 1986, 55:1151)。以后相继发现经热休克预处理的实验动物，能明显对抗缺血/再灌注所致的心肌损伤。1986年Marry将此现象称为“缺血预适应”(ischemia precondition, IP)，进一步的研究发现这种现象与热休克诱导心肌细胞合成一组新的蛋白质—热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)或称应激蛋白(stress protein, SP)有关。这些相继的研究报告，表明心肌自身具有强大的内源性保护机制；以后又发现从原核生物到真核生物，从植物、动物到人，无论培养细胞还是整个机体，热休克处理时都有HSPs合成表达，并表现出如下特点：(1)除热休克可诱导HSP合成外，尚有许多因素，如缺血、缺氧、乙醇、重金属盐、心肌压力负荷、药物及大多数疾病状态都可诱导HSP合成，并可出现“交叉耐受现象”；(2)HSP结构上有高度保守性，如果蝇和酵母菌HSP₇₀有72%氨基酸顺序相同，人类HSP₇₀基因与果蝇HSP₇₀基因有73%同源，HSP₉₀有78%同源。这些结构上的相似，保证了功能上的相同性(Burdon: Biochem, J. 1986, 240:313)；(3)HSP对心肌的保护作用具有最佳时间范围，又称“机会窗”(window of opportunity)，超出一定期限就失去其保护作用(Perdriget: Curr Surg 1989, 23)；(4)HSP存在于整个生物界，存在于高等动物机体的各种细胞。HSPs的诱导不仅增强心肌功能恢复，且也增强心肌内皮功能的恢复，延长心脏停跳时间。上述发现应用于心脏移植的供体保护、缺血心肌的救治、体外循环心脏停跳液的制备等，可突破传统药物束缚，从加强诱导体内细胞本身抗损伤潜能出发，提供一种具有里程碑意义的新途径。

30 Pennica等人(1995)相继在心肌细胞中克隆出cardiotrophin-1(CT-1)基因，并在Escherichia coli中表达。研究表明，CT-1是一种具有免疫调节及诱导生长作用的细胞因子，其天然存在于心肌细胞中，能够使心肌细胞对抗缺氧、高温的损害，并且具有抑制心肌细胞凋亡的作用。深入的研究发现，CT-1在培养的心肌细胞及活体内可诱导HSP表达，这种诱导作用是与一种称为gp¹³⁰的细胞表面多肽有关，其激活gp¹³⁰后，通过NF-IL-6/NF-IL-6 β 及酪氨酸激酶途径而使HSP₇₀、HSP₉₀及HSP小分子物质的表达得到加强，从而增强心肌细胞耐受缺氧及高温的能力。研究还表明，CT-1可以促进心肌细胞结构蛋白的合成，增长细胞的长轴使收缩更加有力。基因重组的Myotrophin的研究是心肌细胞刺激因子的另一课题。Parames(1997)证明，Myotrophin促进

45

50

心肌细胞生长与蛋白激酶-c 有关。Myotrophin 及 Cardiotrophin 可能是心肌细胞中功能相似,但激活细胞生长途径不同的细胞因子,都显示了保护心肌细胞,促进生长的功能。

现有的各类心血管病治疗药物,除转换酶抑制剂具有阻滞生长因子产生,抑制蛋白质合成,减轻心肌肥厚(Hypertrophy)的作用外,其它药物均无直接调节心肌生长、分化、修复的作用。近年来,国外已开始重视使用药物方法诱导心肌自身的保护能力,如转导基因促进心肌细胞再生等的研究,Cardiotrophin 及 Myotrophin 的研究。另一方面,通过细胞外信号触发各种传递机制,调控心肌、血管细胞的增殖或重构。但是所有这些研究都处于动物试验或临床前研究阶段。

上述研究清楚地证明:在体外循环心肌保护方法尚未完善的情况下,设计一种对机体无损害,又能于术前、术中及术后保护心肌的药物,对探索心肌缺血及再灌注损伤的防治,提供新的思路和途径,将有重要意义。

ZL94102798 公开了一种心肌细胞生长刺激肽及其制备方法,选取健康幼年哺乳动物的心脏,采用机械方式捣碎、-20℃深冻-溶解后加热 60-100℃,再-20℃深冻-溶解后离心 3000rpm,经负压截留柱-除菌-分装-冻干-包装,得到分子量小于 20000 道尔顿的多肽类活性物质。

ZL94102799 公开了一种具有刺激原代培养的心肌细胞的 DNA 合成和蛋白质合成的心肌细胞生长刺激肽(GMGSP),是从健康幼年哺乳动物的心脏中制备提取,在 pH2-9 范围内稳定;在加热 95-100℃10 分钟,60-70℃30 分钟下生物活性不改变;在多种蛋白水解酶,37℃2 小时条件下生物活性丧失;在水溶液 22℃-30℃条件下可形成聚合体但生物活性改变不明显;在加入 3%-8%甘露醇冻干密封条件下,室温贮存 1.5 年,4℃贮存 2 年,-20℃贮存 3 年,生物活性不改变;HPLC 分析表明:所述 GMGSP 由四个组分组成,各组分相对峰及保留时间分别为:10.4%(2.88 分),6.4%(3.93 分),36.3%(5.09 分),7.3%(7.41 分),每个组分均具有生物活性;经 SDS-PAGE 分析显示的两条带分子量分别为 8500Da,10800 Da, HPLC 分析数均分子量 9800Da,重均分子量 10500Da,2 个组分均有生物活性。

但上述专利技术对该生物活性肽只是粗略进行了分离、提纯以及简单的活性测试,对其具体成分、用途及效果没有详细说明。

发明内容

本发明的目的在于提供一种心肌肽素,所述心肌肽素主要活性成份为多肽,可直接作用于心肌细胞,促进心肌在多种损伤因素下损伤的修复,为减轻心脏手术中心肌的损伤,促进损伤的修复提供一条新的途径。

本发明还一目的在于提供一种改良的心肌肽素的制备工艺,所述制备工艺简单、产品分子量适中、纯度高、稳定性好,储存 480-540 天时除外观色泽变为微黄色外,其它项目无改变。

本发明另一发明目的是提供该心肌肽素在制备治疗心血管疾病药物方面的用途。

本发明再一发明目的是提供该心肌肽素在制备治疗心肌缺血一再灌损伤药物方面的用途。

为了实现上述目的,本发明采用的技术方案为:一种心肌肽素是从不包括人的健康哺乳动物的心脏中提取的多肽,其多肽含量为 75%~90%,游离氨基酸为 6%~15%,核糖核酸含量小于 2%,脱氧核糖核酸含量小于 7.5%,重均分子量小于 10000 道尔顿。

其中所述不包括人的健康哺乳动物包括猪、牛、羊、兔、马等,优选幼年哺乳动物,包括乳猪、乳牛、乳羊、乳兔、乳马等,最优选乳猪。

所述心肌肽素的重均分子量为小于 10000 道尔顿,可为 1000~10000 道尔顿,优选的重均分子量为 2000~8000 道尔顿,最优选的重均分子量为 2000~5000 道尔顿。

所述心肌肽素在 pH3~8 范围内生物活性稳定,对蛋白酶 K 敏感,85℃ 10min 生物活性不改变,在冷冻或冻干条件下稳定。

所述心肌肽素等电聚焦电泳显示 2~6 条染色带,优选等电聚焦电泳显示 2 条带,其中 pI 为 10.92 带着色较深者。

所述心肌肽素在紫外吸收光谱 190~210 nm 处有一稳定的最大吸收峰,优选在紫外吸收光谱 200±2 nm 处有一最大吸收峰者。

采用茚基水杨酸法鉴定显示所述心肌肽素中不含有蛋白质。

本发明的心肌肽素活力至少为 2.2。

本发明所述心肌肽素中还可包括赋形剂,其重量比组成为:

心肌肽素 15~20

赋形剂 100~375,

优选为 18~20 : 200~375 。

赋形剂可为甘露醇、海藻糖、乳糖、蔗糖或其它冻干用辅料，优选为甘露醇。

为了除热源，本发明所述心肌肽素中还可包括活性炭，其含量为 0.05%~0.1%。

5 本发明所述心肌肽素经 FPLC 分析，心肌肽素主要有 5 个组份峰，相对百分面积相加为 90%~95%，经活性检查，5 个组份峰均能促进原代培养心肌细胞及缺氧再给氧心肌细胞琥珀酸脱氢酶活力，其中 P1 峰活性较强。

10 本发明所述心肌肽素可通过如下方法制成：将不包括人的健康哺乳动物的心室肌洗净、切碎，加灭菌蒸馏水匀浆，匀浆液反复冷冻、解冻 3~4 次，加热至 65~95℃ 过滤除渣，用板框过滤器过滤得到粗滤液，再用中空纤维柱超滤，得到精滤液，用超滤膜超滤，截留分子量小于 10000 Da 的心肌肽素溶液，反渗透浓缩，最后经过质量检查、过滤除菌、灌装、冷冻干燥得到成品。

其中所述灭菌蒸馏水的加入量为哺乳动物的心室肌的 0.5~4 倍；所述匀浆的转速为 1000~5000rpm/min。

15 所述冷冻为在低于 -5℃ 的温度下冷冻 24~72 小时，优选的为在 -20℃~-30℃ 下冷冻 36~48 小时；所述加热方式为采用隔水加热或直接加热，温度为 70~90℃，时间为不超过 2 小时，优选的为采用隔水加热，温度为 75℃~80℃，时间为不超过 1 小时。

20 本发明用板框过滤器过滤得到粗滤液，用中空纤维柱超滤后得到分子量小于 12kDa 的精滤液；再用超滤膜超滤截流得到分子量小于 10kDa 的精滤液；其中所述板框过滤器属于生物制药常规设备，选用小于 10μ 中速滤纸，优选小于或等于 5μ 中速滤纸，比如广州医药器械研究所生产的型号为 XAS03-172/8 的板框过滤器；中空纤维柱可选用型号为 F60 的，能过滤分子量小于 12kDa 的液体，比如瑞士金宝公司的中空纤维柱；超滤膜规格为 1~10kDa，比如 Millipore 公司的产品，反渗透浓缩柱为 Millipore 公司的产品。

本发明所述的过滤除菌和灌装为本领域技术人员所公知的。

25 本发明所述的冷冻干燥采用常用的冷冻干燥设备：冷冻干燥机；具体过程为：5~40 分钟使干燥室内搁板温度达到 -15℃~-20℃，优选 20~30 分钟内达到 -18℃~-20℃，再经 20~40 分钟，使制品温度达到 -25~-35℃，优选 25~35 分钟内达到 -30~-35℃。保持 1~3 小时将冷凝器内温度降到 -40~-50℃，再抽真空，真空度达到 90~100KPa 时，连通干燥室与冷凝器，停止干燥箱的制冷，当干燥箱的真空度为 10~15Pa 时开始升温，升温速度为 2~5℃/min，升温至 5~15℃，保温 3~6 小时，优选以 3~4℃/min 速度升温到 8~12℃，持续 4~5 小时。继续以 8~16℃/min 速度升温至 15~25℃，持续 3~8 小时，优选以 10~12℃/min 速度升温到 18~22℃，持续 4~6 小时。继续以 7~15℃/min 速度升温至 30~35℃，持续 1~4 小时，优选以 9~12℃/min 速度升温到 33~35℃，持续 1.5~2 小时。继续以 4~8℃/min 速度升温至 50~60℃，持续 1~3 小时，优选以 5~7℃/min 速度升温到 54~58℃，持续 1.5~2 小时。进入降温阶段，10~30min 内使温度降至 40~50℃，持续 8~15 小时，优选 15~20min 内使温度降至 45~48℃，持续 9~12 小时，得到外观合格的心肌肽素冻干品，取出制品封口。

35 本发明所述心肌肽素的制备过程中，所得心肌肽素溶液中还可加入常用的冷冻干燥制品的辅料，比如为甘露醇、海藻糖、乳糖、蔗糖或其它冻干用辅料；加入辅料后易形成晶格，起到托架作用，稳定该制品的性状。

40 采用本发明所述的制备方法，经板框过滤器过滤、中空纤维柱超滤和超滤膜超滤的过滤方式，反渗透浓缩后可得到本发明所需的小于 10000 道尔顿心肌肽素，与背景技术中 ZL 94102798 相比，工作时间短，产品的处理量多，得到产品的浓度高，活性大，不易产生热原。

本发明提供了所述心肌肽素在制备治疗心血管药物方面的用途。

本发明还提供了所述的心肌肽素在制备治疗心肌缺血及再灌注损伤药物方面的用途。

本发明所述的心肌肽素冻干制剂静脉滴注的常规用量为 0.1~2.0mg/kg，或遵医嘱。

45 本发明所述的心肌肽素与专利 ZL94102798 和 ZL94102799 公开的心肌细胞生长刺激肽 (GMGSP) 比较，具有明显高的体外生物活性，本发明所述心肌肽素活性单位是心肌细胞生长刺激肽的 3~5 倍，体内药效对比数据显示，其对心肌缺血一再灌注损伤所致心肌磷酸肌酸激酶释放及乳酸脱氢酶活性与游离脂肪酸和丙二醛含量具有明显有利影响。

50 本发明所述的心肌肽素为可直接作用于心肌细胞，促进在多种损伤因素下损伤心肌的修复（如缺血、药物中毒等），促进蛋白质合成、降低氧自由基损伤、降低钙超载、诱导内源性保护、提高心肌代谢功能的药物，为减轻心脏手术中心肌的损伤，促进损伤的修复提供一条新的途径。

心肌肽素的主要药效学研究结果如下：

1. 心肌肽素能明显减轻心肌缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤, 使其接近或恢复正常 (图 6-12 黑白照片, 表 13)。
2. 心外膜心电图显示心肌肽素能明显对抗猫心肌缺血所致的 ST 段升高, 减少心肌缺血范围 (表 14-15)。
- 5 3. 心肌肽素能明显减低心肌缺血一再灌注损伤所致心肌磷酸肌酸激酶释放及乳酸脱氢酶活性与游离脂肪酸和丙二醛含量的增高 (表 16-21)。
4. 心肌肽素能降低心肌耗氧量 (表 22)。
5. 心肌肽素 5、10mg/kg 可明显降低心肌梗塞猪心外膜心电图的 ST、减少 NST, 并缩小心肌梗塞范围, 对急性心肌缺血猪出现的心律失常、室颤所致死亡有一定的治疗作用, 而对血压、
- 10 心率无明显影响 (表 23、图 13)。

附图说明

- 图 1 心肌肽素 HPLC 分子量图谱
- 图 2 心肌肽素 FPLC 分离纯化图谱
- 15 图 3 心肌肽素等电点测定图谱
- 图 4 心肌肽素紫外扫描图谱
- 图 5 心肌肽素 HPLC 鉴别图谱
- 图 6 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之正常对照组
- 图 7 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之生理盐水对照组
- 20 图 8 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之损伤对照组
- 图 9 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之心肌肽素 10mg/kg 组, 能明显减轻心肌缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤
- 图 10 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之心肌肽素 5mg/kg 组, 能减轻心肌缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤
- 25 图 11 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之心肌肽素 1mg/kg 组
- 图 12 心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤影响实验之普洛萘尔 2mg/kg 组
- 图 13 心肌肽素 5、10mg / kg 可明显降低心肌梗塞猪心外膜心电图的 ST、减少 NST
- 图 14 心肌肽素产品工艺流程图

30 详细说明

下面实施例进一步描述本发明, 但所述实施例仅用于说明本发明而不是限制本发明。

实验例 1

本实验例涉及心肌肽素溶液的理化性质、纯度、含量和活性实验

一、心肌肽素的理化性质、纯度、含量

- 35 本发明所述的心肌肽素为小分子活性多肽, 在 pH3-8 范围内生物活性稳定, 对蛋白酶 K 敏感, 85°C 10min 生物活性不改变, 在冷冻或冻干条件下稳定; 经 HPLC 分析, 重均分子量小于 10000Da (见图 1), 优选重均分子量 2000-8000Da。

表 1 不同 pH 条件下、不同时间对心肌肽素活性的影响 (MTT 法) ($\bar{x} \pm s$, n=8)

		心肌肽素活性 OD 值 (x±s)	
分组		30 μ g/ml	5 μ g/ml
正常对照组		0.691±0.032**	
阿霉素损伤组		0.274±0.011	
不同 pH 处理组			
3.0	30min	0.331±0.014**	0.320±0.015**
	60 min	0.314±0.007**	0.309±0.010**
4.0	30min	0.315±0.008**	0.307±0.015**
	60 min	0.334±0.015**	0.311±0.007**
5.0	30min	0.364±0.022**	0.379±0.019**
	60 min	0.364±0.017**	0.353±0.023**
6.0	30min	0.341±0.023**	0.344±0.011**

	60 min	0.332±0.015**	0.327±0.016**
7.0	30min	0.320±0.018**	0.358±0.023**
	60 min	0.327±0.010**	0.328±0.012**
8.0	30min	0.339±0.008**	0.332±0.022**
	60 min	0.308±0.01**5	0.309±0.010**
9.0	30min	0.313±0.006**	0.289±0.020
	60 min	0.279±0.017	0.274±0.013

注：**与损伤组比较 P<0.01

从表1可看出在pH3-8范围内心肌肽素生物活性稳定。

经FPLC分析,心肌肽素主要有5个组份峰,相对百分面积相加为90%-95%。活性检查,5个组份峰均能促进原代培养心肌细胞及缺氧再给氧心肌细胞琥珀酸脱氢酶活力(表2),其中P1峰活性较强(见图2)。心肌肽素多肽含量占75-90%,游离氨基酸占6-15%,尚有微量核酸和微量元素。等电聚焦电泳显示有2条染色带,其中pI为10.92带着色较深(见图3)。

表2 心肌肽素各组分对心肌细胞酶活力的影响(MTT法)(n=8, $\bar{x} \pm s$)

分组	OD值($\bar{x} \pm s$)	t值
	5 μ g/ml	
正常对照组	0.344±0.014**	9.93
阿霉素损伤组	0.272±0.015	
P1	0.318±0.004**	6.344
P2	0.295±0.012**	3.39
P3	0.309±0.012**	5.45
P4	0.317±0.017**	5.61
P5	0.303±0.014**	4.27
心肌肽素组	0.298±0.005**	3.47

注:与阿霉素组比较, **P<0.01

从表2中可以看出5个组份峰均能促进原代培养心肌细胞琥珀酸脱氢酶活力。

10 1. 多肽的鉴别

取心肌肽素含量为2.5mg/ml的心肌肽素溶液1ml,加水2ml溶解,加双缩脲试剂2ml【双缩脲试剂制备方法:取硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)0.75g与酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)3g,加水约250ml溶解,在搅拌下加10%氢氧化钠试液150ml,并加水稀释到500ml,贮存于塑料瓶中。】,混匀,显兰紫色,即为含有多肽;经6批次检查,本发明的心肌肽素均显兰紫色,即含有多肽。

15 2. 含量测定

(1) 半微量凯氏定氮法

心肌肽素溶液,批号960419, 960422, 960423;注射用心肌肽素, 960501, 960502, 960503, 临用时用水溶解至所需浓度。

试剂 硫酸:化学纯,比重1.84;消化剂:硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)1份与硫酸钾(K_2SO_4)10份共同研细混匀即成;12.5mol/L氢氧化钠溶液;2%硼酸吸收液;10%钨酸钠;0.33mmol/L硫酸;混合指示剂:0.2%(W/V)溴甲酚绿酒精溶液5份与0.1%(W/V)甲基红酒精溶液2份混合配成;0.01mol/L盐酸。

计算公式:

(样品滴定数-空白滴定数)×标准盐酸

25 样品总氮含量(g/L) = $\frac{\text{样品毫升数}}{\text{样品毫升数}}$

测定法 照氮测定法(见中国药典1995年版二部附录VII D 第二法)测定。

无机氮:精密量取供试品5ml,加水3ml,加入10%钨酸钠1ml,0.33mmol/L硫酸1ml,摇匀,静置30分钟,过滤。精密量取过滤液5ml及氢氧化钠试液5ml,加入蒸馏瓶中,照总氮项下

30 同法蒸馏测定。

总氮量:取注射用心肌肽素一瓶,准确加水4ml溶解,精密量取2.0ml;精密量取心肌肽素溶液2.0ml,分别照总氮测定法测定。

有机氮量=总氮量-无机氮量

注：(1) 在测定无机氮时，由于供试品在蒸馏过程中容易产生泡沫，将氢氧化钠带入冷凝管，流入收集液中，使测定结果偏高，应在蒸馏前加入10%钨酸钠及0.33 mmol/L硫酸去除有机物，取滤液测定无机氮。

(2) 供试品以多肽物质为主要成份，由于在生产过程中可能会带入无机物产生无机氮而影响测定结果。本法在测定总氮后，测定无机氮，以总氮量减去无机氮量作为有机氮量。

结果与分析

不同批号心肌肽素溶液及制剂的氮含量(见表 3)。

表 3. 不同批号供试品氮测定结果

	心肌肽素溶液(mg氮/ml)			注射用心肌肽素(mg氮/瓶)		
批号	960419	960422	960423	960501	960502	960503
总氮	1.788	1.926	1.628	3.816	4.250	4.100
有机氮	1.589	1.743	1.460	3.612	3.919	3.722
无机氮	0.199	0.183	0.168	0.204	0.331	0.378

表3显示，心肌肽素溶液有机氮含量在1.46-1.74 mg/ml之间，注射用心肌肽素有机氮含量在3.61-3.92 mg/瓶范围。平均含量分别为1.60 mg氮/ml和3.75 mg氮/瓶。

(2) 福林-酚法(Folin-phenol)

心肌肽素溶液，批号 960419，960422，960423；注射用心肽素，批号960501，960502，960503；临用时用水溶解成适宜浓度。对照品：牛血清白蛋白(中国药品生物制品检定所)批号 9607。

仪器 7221型分光光度计，上海。

试剂配制：

4%碳酸钠溶液 取碳酸钠($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 4 g加水溶解并稀释至100 ml，摇匀。

0.2mol/L氢氧化钠溶液 取氢氧化钠(NaOH) 0.8g，加水溶解并稀释100 ml，摇匀。

1%硫酸铜溶液 取硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1g加水溶解并稀释至100 ml，摇匀，即得。

2%酒石酸钾溶液 取酒石酸钾($\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) 2g，加水溶解并稀释至100ml，摇匀。

碱性铜试液 临用前取试液1和2各25 ml，试液3和4各0.5 ml，混匀。

酚试液 取钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 g、钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25 g，置1500 ml烧瓶中，加水700 ml、85%磷酸50 ml、盐酸 100 ml，上连回流管(用软木塞或锡纸包裹的橡皮塞)微沸回流10小时，取下冷凝管，加入硫酸锂(Li_2SO_4) 150 g，全溶后，再加水50 ml及溴液数滴，摇匀，煮沸15分钟，驱除过量的溴。冷却至室温，加水稀释至1000 ml，过滤，滤液即为贮备液，贮于棕色瓶中，置冰箱内保存。临用时，取贮备液用水作倍量稀释，即得。

标准曲线绘制

对照品溶液的制备 精密称取干燥的牛血清白蛋白对照品(中国药品生物制品检定所提供)100 mg，置100 ml量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，精密量取10.0 ml，置100 ml量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀即得。

标准曲线的制备 精密量取对照品溶液0.0、0.2、0.4、0.6、0.8及1.0 ml，分别置具塞试管中，并各管加水使成1.0 ml，每管各加碱性铜溶液5.0 ml，摇匀，室温放置 10分钟。再依次快速加入酚试剂0.5 ml，立即摇匀，置水浴(35℃)中保温30分钟。取出，冷却至室温，以对照品溶液0.0 ml管作空白，照分光光度法(中国药典1995年版二部附录IV A)在660 nm波长处测定吸收度。以吸收度为纵座标，蛋白质浓度为横座标，绘制标准曲线。

测定法 取本品，分别加水溶解或稀释并定量转移至50 ml量瓶中，加水至刻度，摇匀。精密吸取10.0 ml，置50ml量瓶中，加水至刻度，摇匀。精密吸取1.0 ml置具塞试管中，照标准曲线制备项下自“加碱性铜试液”起到测定吸收度，在标准曲线上查得相应浓度，计算，即得。

结果与分析

所测结果见表4。

所测结果心肌肽素溶液每1 ml含多肽在2.6-2.8 mg范围；注射用心肌肽素每瓶含9.2-9.9 mg。为保证溶液及制剂含量恒定，我们规定心肌肽素溶液多肽含量应大于每毫升2.5 mg，注射心肌肽素每瓶多肽含量在9.0-11.0mg。

表 4. 三种含量测定方法的测定结果比较

溶 液 (mg/ml)	测定方法		
	双缩脲法	福林-酚法	定氮法(多肽有机氮)
960419	1.65	2.7	1.58
960422	1.85	2.8	1.74
960423	2.00	2.6	1.46
制 剂 (mg/瓶)			
960501	3.26	9.9	3.61
960502	3.63	9.2	3.92
960503	3.73	9.2	3.72

注: *双缩脲法由全自动生化分析仪测定

- 5 从表 4中可以看出三种测定方法不一致, 结果出入较大。考虑到福林-酚法的反应原理是芳香族氨基酸的酚基反应, 特异性较好, 操作简便。选用特定的对照品及每次测定均绘制标准曲线可克服非线性关系, 我们选用福林-酚法测定心肌肽素溶液和注射用心肌肽素的多肽含量。

(3) 组成比例分析

该制品主要由多肽组成, 分别测定其有机氮含量, 由总有机氮含量减去游离氨基酸有机氮含量即为多肽有机氮含量。

- 10 试剂与方法同前(见定氮法)。

结果 3个批号的注射用心肌肽素游离氨基酸含氮量见表5。

表5 注射用心肌肽素游离氨基酸含氮量

注射用心肌肽素				
批 号		960501	960502	960503
游离氨基酸总氮量	g/L	0.257	0.285	0.286

注射用心肌肽素有机氮含量与游离氨基酸含氮量比较(见表 6)

表6 总氮量与游离氨基酸含氮量比较

注射用心肌肽素				
批 号		960501	960502	960503
多肽有机氮	g/L	3.612	3.919	3.722
游离氨基酸总氮量	g/L	0.257	0.285	0.286
游离氨基酸含氮量占总有机氮量百分比	%	6.643	6.823	7.135

- 15 从表 5, 6可以看出, 注射用心肌肽素游离氨基酸含氮量仅占供试品含氮量的6.643%-7.135%, 表明供试品多肽占总氮量的绝大部分。鉴于该品多肽是生物学活性的主要成份以及考虑到生产工艺的稳定可控, 我们规定注射用心肌肽素多肽比例应达到75%-90%。

3. 紫外扫描分析

日本岛津2201型紫外分光光度计, 照分光光度法(中国药典1995年版二部附录IV A)测定。

- 20 结果显示, 心肌肽素溶液在199.8-201.2 nm 处有最大吸收峰, 注射用心肌肽素在200.4-201.8 nm处显示最大吸收峰(图4)。表明3批溶液与3 批制剂紫外扫描图谱一致, 供试品主要成分为多肽, 心肌肽素制取工艺稳定。

表7 心肌肽素的紫外扫描吸收波长

批 号	吸 收 波 长(nm)
溶 液 (mg/ml)	
960422	200.4
960423	199.8
960419	201.2
制 剂 (mg/瓶)	
960501	200.4
960502	201.8

960503

201.6

4. 蛋白质的鉴别

取本发明心肌肽素含量 2.5 mg/ml 的心肌肽素 2 ml, 加 20% 磺基水杨酸溶液 1ml, 不产生混浊, 心肌肽素三批溶液及制剂测定结果显示均不含蛋白质。用磺基水杨酸法检查蛋白质, 既可以对可能混入的蛋白质进行监测, 同时亦可证明双缩脲法所显示的兰紫色是多肽而不是其它物质。

5. 分子量及肽色谱图检查

HPLC 法测定分子量

HP1050 液相色谱仪

色谱条件: 流动相: 硫酸钠 (0.1mol/L)-磷酸二氢钠 (0.05mol/L)-叠氮钠 (0.05%), 用 NaOH 调 pH 至 6.8; 流速: 0.35ml/min; 柱: TOSOH TSK G2000sw 7.5mm×300mm; 柱温: 25℃; 检测波长: 280nm; 进样量: 10μl。

分别取细胞色素 C (MW=12400), 抑肽酶 (MW=6700) 及维生素 B₁₂ (MW=1355) 适量, 分别用流动相制成适宜浓度的对照品溶液。取供试品注射用心肌肽素 1 瓶, 多肽含量 10mg, 用流动相制成每 1ml 含 5mg 的供试品溶液。分别取对照品溶液和供试品溶液, 按色谱条件注入色谱仪, 分别测定其保留时间。用最小二乘法作对照品的回归方程, 相关系数不得小于 0.99。按下式绘制标准曲线及计算供试品分子量。

$$\lg MW = A + B \cdot t_R$$

$$\lg MW = 6.8405 - 0.1219 t_R \quad \gamma = -0.9990$$

式中 MW 为分子量, A 为常数, B 为斜率, t_R 为保留时间 (分钟)。

结果见表 5、6。

表 8 注射用心肌肽素色谱峰相对百分面积的保留时间

批 号	色谱峰保留时间 (min)				
	P1	P2	P3	P4	P5
960501	30.5	31.8	32.8	35.0	38.7
960502	30.5	31.2	32.8	35.0	38.7
960503	31.2		32.7	35.0	38.7
X	30.7	31.5	32.7	35.0	38.7

表 9 注射用心肌肽素的峰位分子量

批 号	分子量 (道尔顿)				
	P1	P2	P3	P4	P5
960501	6023	4588	3665	2233	969
960502	6027	5261	3688	2234	971
960503	5165	3709		2236	875
X	5736	4519	3676	2234	971

$$X = 6.7444 - 0.09696 \times Y = -0.9937$$

注射用心肌肽素的分子量分布范围在 922-6027Da, 最大分子量范围在 5214-6027Da (图 1), 显示该供试品为小分子多肽, 分子量小于 10000 道尔顿, 不易产生过敏反应。

6. 核酸

注射用心肌肽素, 每瓶含多肽 10mg。加蒸馏水 4ml 溶解, 再加入等体积苯酚抽提一次。取上清测定 DNA 含量。将此上清加双倍体积无水乙醇及 1/20 体积的 10mol/L 乙酸铵, 置 -80℃, 30min, 12000rpm×20min, 弃上清, 将沉淀溶于 4ml 蒸馏水中。此样品用于测定 RNA 含量。

(1) RNA 含量测定

标准曲线的制备:

取试管 6 支, 按下表加入试剂

	加入量 ml					
加入物	0	1	2	3	4	5
RNA 标准液	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
地衣酚试剂	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

将各管混匀, 置沸水浴中加热 20min, 取出, 冷水冷却至室温, 用分光光度计在 670nm 波长下, 以“0”号管调零, 测定各管吸光度。以 RNA 含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

样品 RNA 含量测定:

- 5 取试管 4 支, 分别标以“空白管”和“测定管”。在空白管中加入蒸馏水 1.0ml, 在测定管中加入 RNA 样品溶液 1.0ml, 然后每管加入地衣酚试剂 3.0ml, 混匀, 置沸水中 20min, 取出, 冷水浴冷却至室温, 用分光光度计在 670nm 波长下, 以空白管调零, 测定样品管吸光度, 在标准曲线上查出 RNA 含量取平均值。

(2) DNA 含量测定

标准曲线的制备:

- 10 取试管 6 支, 按下表加入试剂

加入物	加入量 ml					
	0	1	2	3	4	5
RNA 标准液	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
DH ₂ O	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
二苯胺试剂	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

将各管混匀, 置 60℃水浴中加热 60min, 取出, 冷水冷却至室温, 用分光光度计, 在 595nm 波长下, 以“0”号管调零, 测定各管吸光度。以 DNA 含量为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

样品 DNA 含量测定:

- 15 取试管 3 支, 分别标以“空白管”和“测定管”(3 支), 在空白管中加入蒸馏水 1.0ml, 在测定管中加入 DNA 样品溶液 1.0ml, 然后每管加入二苯胺试剂 3.0ml, 混匀, 置 60℃水浴中加热 60min 取出, 置冷水浴冷却至室温。用分光光度计在 595nm 波长下以空白管调零, 测定样品管吸光度。在标准曲线上查出 DNA 含量, 取平均值。

结果显示: 注射用肌肽素每瓶含 RNA 不超过 200 μg (2%); DNA 不超过 750 μg (7.5%)。

- 20 7. 活力

受试药物: 注射用肌肽素批号为 960501, 960502, 960503, 960101, 多肽含量为 10mg/瓶。采用原代心肌细胞培养法。

实验结果: (结果见表 10)。

表 10 肌肽素活力测定 t 值(n=6)

批 号	t 值
960501	5.8
960502	3.2
960503	7.9
960101	7.8

- 25 8. HPLC 法鉴别注射用肌肽素

仪器: HP1100, Module liquid chromatograph No DE 70300954

色谱条件: 流动相: 甲醇: 水=10: 90

柱: ymc-park ODS -A A-302 150mm×4.6mm I.D S-5 μm 120A No 041543847 (W)

柱温: 26℃。检测波长: 254nm。流速: 0.8ml/min。进样量: 10 μl。

- 30 测定法: 取供试品, 每瓶加流动相 10ml, 待完全溶解后, 供试验用。

供试品批号分别为 960101、960501、960502、960503、961101、961103、971201、980301。

结果显示: 10 批供试品主要显示 4—5 个主峰, 相对百分峰面积大于 85%, 各主峰保留时间十分相近 (见图 7、表 11, 12)。

表 11 各主峰保留时间

主峰	保留时间 (min)								
	101	501	502	503	1101	1102	1103	201	301
P1	1.922	1.901	1.920	1.915	1.925	1.924	1.949	1.954	1.990
P2	2.506	2.504	2.500	2.502	2.643	2.639	2.640	2.638	2.638
P3	2.654	2.651	2.646	2.645					
P4	3.156	3.144	3.134	3.128	3.124	3.114	3.117	3.115	3.115

P5	4.240	4.203	4.181	4.159	4.148	4.128	4.133	4.129	4.107
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

表 12 各主峰相对百分峰面积

百分面积%									
主峰	101	501	502	503	1101	1102	1103	201	301
P1	18.3	12.3	13.4	15.7	13.4	13.5	11.4	14.4	16.1
P2	10.6	11.7	9.2	12.4	5.2	5.2	5.1	5.8	4.7
P3	10.4	13.3	11.1	8.8					
P4	37.4	45.4	47.8	38.6	43.8	43.4	47.3	46.8	42.2
P5	13.2	8.8	9.6	15.9	22.8	22.6	22.9	18.5	23.6

将 4℃ 贮存 3 年至 11 个月的供试品在前述色谱条件进行分析, 10 个批号的供试品的保留时间十分接近, 选主峰 1、4、5 相对保留时间的比例 (3 个峰的相对百分面积相加大于 66%) 作为鉴别指数。经计算主峰 1、4、5 相对保留时间比例应为 1: 1.61: 2.14 (± 0.1)。

5

实验例 2

本发明对所述的心肌肽素进行了主要药效学的试验, 在整体和离体心肌缺血及缺血一再灌注模型上观察了心肌肽素对心肌形态学指标、生理指标及生化指标的影响以及对心肌耗氧量的影响。研究结果如下:

1、心肌肽素对缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤的影响

10

参考文献方法, 结扎大鼠冠状动脉 LAD 5 min 后, 舌下静脉注射心肌肽素或对照药, 心肌缺血 10 min 后松开结扎线, 再灌 30 min, 同时记录 II 导联 ECG。再灌结束后自腹主动脉取血, 取出心脏, 以生理盐水经主动脉灌流冲洗干净后, 再以 6% 戊二醛 0.1 M 二甲胍酸钠缓冲液灌流并固定 2 h, 取左前壁缺血心肌, 切成 1 mm³ 的小块浸入 4% 戊二醛 0.1 M 二甲胍酸钠缓冲液中固定, 以备制作电镜标本。经锇酸固定后, 系列丙酮脱水, 618 环氧树脂包埋及聚合后切片, 每只动物切 4 个包埋块。每组动物随机拍照 20 张, 底片倍率均为 12000, 观察超微结构改变, 按线粒体、心肌纤维及其它成分损伤的病变种类及严重程度分级定值。实验共分 7 组, 分别为假手术 (P—O) 组; 缺血一再灌注 (I—R) 组; 缺血一再灌注+生理盐水或普洛萘尔 (I—R+N.S, I—R+Pro) 组; 缺血一再灌注+心肌肽素 (I—R+MTP) 3 个剂量组。

15

表 13 心肌肽素对缺血一再灌注大鼠心肌电镜半定量组织学的影响 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 mg/Kg	病变值 \pm SD
假手术	—	0.36 \pm 0.46
缺血一再灌注	—	1.97 \pm 1.4 $\triangle\triangle\triangle$
缺血一再灌注+生理盐水	—	2.68 \pm 1.3*
缺血一再灌注+心肌肽素	1.0	1.85 \pm 1.6*
	5.0	0.73 \pm 0.96***
	10.0	0.33 \pm 0.42***
缺血一再灌注+心得安	2.0	0.71 \pm 0.84***

20

注: 与假手术对照组比较, $\triangle\triangle\triangle P < 0.01$; 与缺血一再灌注组比较, * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$

通过试验可发现心肌肽素能明显减轻心肌缺血一再灌注所致的心肌超微结构损伤, 使其接近或恢复正常 (见图 6-12)。

2. 心肌肽素对心肌缺血的影响

25

参考文献方法并作改正, 猫开胸暴露心脏后剪开 LAD 处心包, 用塑料套管压迫法造成急性心肌缺血 10 min, 松开 30 min, 将带有 5 组 (每组 3 根) 电极的布片缝于缺血心肌心包处, 记录每组 I、II、III 导联心外膜心电图, 同时行股动脉插管记录动脉血压。取缺血 1'、4'、7' 及再灌 1'、5'、10'、20' 和持续阻断 1'、5'、10'、15'、20'、30'、40'、50'、60' 为记录时间点。以 ST 段抬高或下降的毫伏数代表 ST 段改变。每只猫阻断 5 次, 第四次阻断前 5 min 静脉给不同的药物, 第五次持续阻断 LAD, 于持续阻断后 20 min, 30 min, 40 min 静脉给予不同剂量的心肌肽素, 心得安于持续阻断 30 min 后给药。分别统计各组第 3、4、5 次阻断时 $\Sigma \Delta ST$ 及 ΣNST 。实验分为缺血一再灌注组 (I—R); 缺血一再灌注+生理盐水组 (I—R+N.S); 缺血一再灌注+心肌肽素 2.0, 5.0, 10.0 mg/kg 组 (I—R+MTP 2.0, 5.0, 10.0 mg/kg); 及缺血一再灌注+心得安组 2.0 mg/kg (I—R+Pro) 共 6 组。

30

表 14 心肌肽素预防性给药对猫心外膜心电图缺血期 $\Sigma \Delta ST$ 及 ΣNST 的影响 ($x \pm s$)

组 别	剂量	n	$\Sigma \Delta ST$	ΣNST
	mg/Kg		mV	个
缺血一再灌注组	—	10	109 \pm 32	28.9 \pm 5.2
缺血一再灌注+生理盐水组	—	10	115 \pm 24*	31.1 \pm 5.1*
缺血一再灌注+心肌肽素组	2.0	6	70.8 \pm 16***	19.5 \pm 4.8***
	5.0	6	37.8 \pm 12***	9.33 \pm 3.9***

注: 与缺血一再灌注组比较, * $P > 0.05$; *** $P < 0.01$

表 15. 心肌肽素治疗性给药对猫心外膜心电图 $\Sigma \Delta ST$ 及 ΣNST 的影响 ($x \pm s$)

组 别	剂量	n	$\Sigma \Delta ST$	ΣNST
	mg/Kg		mV	个
缺血组	—	12	40.5 \pm 10	11.1 \pm 2.1
缺血+生理盐水组	—	12	40.0 \pm 12*	11.2 \pm 1.5*
缺血+心肌肽素组	2.0	6	29.9 \pm 2.9***	8.67 \pm 2.2**
	5.0	6	25.6 \pm 5.7***	7.33 \pm 1.5***
	10.0	6	19.7 \pm 4.0***	6.17 \pm 1.2***
缺血+心得安组	2.0	6	22.8 \pm 6.4***	6.17 \pm 1.5***

5 注: 与缺血一再灌注组比较, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

通过心外膜心电图显示心肌肽素能明显对抗猫心肌缺血所致的 ST 段升高, 减少心肌缺血范围。

3. 心肌肽素对心肌缺血一再灌注损伤所致心肌磷酸肌酸激酶释放及乳酸脱氢酶活性与游离脂肪酸和丙二醛含量的影响

10 (1) 参考文献方法制作心肌缺血一再灌注损伤动物模型, 舌下静脉注射 MTP 或维拉帕米 (verapamil, Ver) 后 5 min 结扎大鼠冠状动脉左前降支 10 min, 再灌注 30 min, 以多导生理仪连续观察并记录 II 导联 ECG, 再灌结束后取左心血 2 ml, 心脏经主动脉灌流后取左室心尖部心肌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 48 h 内检测。实验分组: 实验分为假手术对照组 (pseudo-operation, P—O); 缺血一再灌注组 (ischemia—reperfusion, I—R); 缺血一再灌注+生理盐水组 (I—R+N.S); 缺血一再灌注+心肌肽素 0.5、2.0、10.0 mg/Kg 组 (I—R+MTP) 及缺血一再灌注+维拉帕米 1.0mg/Kg (I—R+Ver) 等 7 组, 每组 8-10 只动物。

表 16. 心肌肽素预防性给药对缺血一再灌注大鼠心肌及血浆 CPK 活性的影响 ($x \pm s$)

组 别	剂量	n	心肌 CPK	血浆 CPK
	mg/Kg		u/100 mg pro	u/100 ml
假手术	—	10	980 \pm 63	164 \pm 64
缺血一再灌注	—	10	522 \pm 65 $\Delta\Delta\Delta$	374 \pm 54 $\Delta\Delta\Delta$
缺血一再灌注+生理盐水	—	8	501 \pm 59*	337 \pm 48*
缺血一再灌注+心肌肽素	0.5	8	732 \pm 98***	210 \pm 50***
	2.0	8	904 \pm 95***	157 \pm 31***
	10.0	8	976 \pm 95***	134 \pm 24***
缺血一再灌注+维拉帕米	1.0	8	886 \pm 115***	192 \pm 60***
缺血一再灌注+心肌细胞生长刺激肽	5.0	8	890 \pm 97***	199 \pm 35***

注: 与假手术对照组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$; 与缺血一再灌注组比较, * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$

20 表 17. 心肌肽素预防性给药对缺血一再灌注大鼠心肌及血浆 LDH 活性的影响 ($x \pm s$)

组 别	剂量	n	心肌 LDH	血浆 LDH
	mg/Kg		u/mg pro	u/ml
假手术	—	10	76.7 \pm 19	40.9 \pm 9.5
缺血一再灌注	—	10	110 \pm 27 $\Delta\Delta\Delta$	120 \pm 20 $\Delta\Delta\Delta$
缺血一再灌注+生理盐水	—	8	112 \pm 19*	116.2 \pm 12*

缺血—再灌注+心肌肽素	0.5	8	97.1±12*	93.9±17***
	2.0	8	76.3±22***	59.7±12***
	10.0	8	64.8±17***	52.6±13***
缺血—再灌注+维拉帕米	1.0	8	75.1±23***	46.7±8.8***
缺血—再灌注+心肌细胞生长刺激肽	5.0	8	83.0±17***	60.9±15***

注：与假手术对照组比较， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ，与缺血—再灌注组比较， $*P > 0.05$ ， $***P < 0.01$

表 18. 心肌肽素预防性给药对缺血—再灌注大鼠心肌及血浆 MDA 含量的影响 ($x \pm s$)

组 别	剂量	n	心肌MDA	血浆MDA
	mg/Kg		nmol/100 mg pro	nmol/ml
假手术		10	68.3±8.4	22.3±1.8
缺血—再灌注		10	135±10 $\Delta\Delta\Delta$	63.6±11 $\Delta\Delta\Delta$
缺血—再灌注+生理盐水		8	127±15*	58.4±11*
缺血—再灌注+心肌肽素	0.5	8	73.1±13***	38.1±6.2***
	2.0	8	60.5±10.4***	27.7±5.5***
	10.0	8	49.8±9.4***	25.5±5.1***
缺血—再灌注+维拉帕米	1.0	8	66.6±19.8***	24.9±6.6***
缺血—再灌注+心肌细胞生长刺激肽	5.0	8	75.2±9.7***	39.2±5.3***

注：与假手术对照组比较， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ；与缺血—再灌注组比较， $*P > 0.05$ ， $***P < 0.01$

表 19 心肌肽素对缺血—再灌注大鼠血清 FFA 含量的影响 ($n=8$, $x \pm s$)

组 别	剂量	FFA
	mg/Kg	$\mu\text{mol}/100\text{ ml}$
假手术	—	60.6±7.8
缺血—再灌注	—	129±26 $\Delta\Delta\Delta$
缺血—再灌注+生理盐水	—	121±10*
缺血—再灌注+心肌肽素	1.0	85.4±5.0***
	5.0	77.7±7.1***
	10.0	71.4±11***
缺血—再灌注+心得安	2.0	77.1±6.4***
缺血—再灌注+心肌细胞生长刺激肽	5.0	89.2±6.7***

5 注：与假手术对照组比较， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ；与缺血—再灌注组比较， $*P > 0.05$ ， $***P < 0.01$

本发明所述的心肌肽素与专利 ZL94102798 和 ZL94102799 公开的心肌细胞生长刺激肽 (GMGSP) 比较，具有明显高的体外生物活性，本发明所述心肌肽素活性单位是心肌细胞生长刺激肽的 3-5 倍，体内药效对比数据显示，其对心肌缺血—再灌注损伤所致心肌磷酸肌酸激酶释放及乳酸脱氢酶活性与游离脂肪酸和丙二醛含量具有明显有利影响（见表 16-19）。

- 10 (2) 参考文献方法制作离体大鼠 Langendorff's 心脏缺氧—复氧损伤动物模型，以高 Ca^{2+} ，低 K^{+} 并持续充入混合气体的 K-H 液进行 Langendorff's 灌流，将两根铂丝分别勾于心尖和左房根部，记录心电图。LAD 结扎 10 min，松开 15 min，给药组在结扎前 5 min 至松开后 5 min 均以含相应浓度药物的 K-H 液灌流。分别收集结扎前、结扎后 8 min 及松开后 2 min 的流出液测定有关指标。灌流结束后取左室前、后壁心肌，4℃ 保存，48 h 内检测 CPK、LDH 及 MDA。实验分为假
- 15 手术对照组 (pseudo-operation, P-O)；缺氧—复氧组 (anoxia—reoxygenation, A-R)；缺氧—复氧+心肌肽素 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (终浓度, A-R+MTP) 组及缺氧—复氧+维拉帕米 1.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (A-R+Ver) 等 6 组，每组 10 只动物。

表 20. 心肌肽素对离体大鼠心肌缺血—再灌注时冠脉流出液 CPK 活性的影响 ($n=10$, $x \pm s$)

组 别	剂量	冠脉流出液 CPK (U/L)		
	$\mu\text{g}/\text{ml}$	缺血前	缺血期	再灌期
假手术	—	15.3±1.5	16.5±1.8	17.1±2.0

缺血—再灌流	—	16.3±2.3△	24.8±2.7△△△	35.4±4.3△△△
缺血—再灌流+ 心肌肽素	10	16.1±2.6*	20.7±1.7***	22.7±2.3***
	50	15.6±1.7*	17.9±2.7***	19.0±2.3***
	100	15.5±2.7*	15.3±2.1***	16.5±2.4***
缺血—再灌流+ 维拉帕米	1	16.3±2.0*	16.2±2.8***	16.0±1.8***

注：与假手术对照组比较， $\Delta P > 0.05$ ， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ；与缺血—再灌流组比较， $*P > 0.05$ ， $***P < 0.01$

表 21. 心肌肽素对离体大鼠心肌缺血—再灌流冠脉流出液 LDH 活性的影响 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量	冠脉流出液 LDH (U/L)		
	$\mu\text{g/ml}$	缺血前	缺血期	再灌期
假手术	—	11.8±0.79	12.6±1.1	11.8±0.69
缺血—再灌流	—	11.7±0.83△	17.3±1.9△△△	24.7±1.7△△△
缺血—再灌流+ 心肌肽素	10	12.0±0.58*	13.4±1.1***	15.3±1.4***
	50	11.8±0.53*	12.9±1.1***	13.4±0.76***
	100	11.2±0.55*	12.2±0.79***	12.9±0.93***
缺血—再灌流+ 维拉帕米	1	11.4±0.78*	13.0±0.62***	14.3±0.95***

注：与假手术对照组比较， $\Delta P > 0.05$ ， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ；与缺血—再灌流组比较， $*P > 0.05$ ， $***P < 0.01$

通过试验表明心肌肽素能明显减低心肌缺血—再灌流损伤所致心肌磷酸肌酸激酶释放及乳酸脱氢酶活性与游离脂肪酸和丙二醛含量的增高。

4. 心肌肽素对心肌耗氧量的影响

狗戊巴比妥钠麻醉，气管插管，人工呼吸，用 RM-86 型多导生理仪监测心电图与主动脉压。左侧开胸，暴露心脏，从心尖插管至左心室，心左室压及压力变化速度 ($\pm dp/dt \max$)。为了解冠脉循环与心肌 O_2 代谢的变化，分离狗的冠状动脉左旋支，用电磁流量计测冠脉流量，计算冠脉阻力。从狗的颈外静脉插管至冠状，同时抽取动脉血与冠状窦血，用血气分析仪 (ABL-3 型，丹麦) 测定血 O_2 含量，计算心肌 O_2 摄取率与心肌耗 O_2 量。实验过程中保持狗的动脉血 $pHCO_2$ 与 O_2 分压在正常范围。MTP 剂量为 2, 5, 10mg/kg，二个剂量间隔 30min。给药后连续记录各项参数，直至基本恢复到对照值。给药后 2, 5, 10, 30min 取动脉血与冠状窦血，测血气含量，计算心肌 O_2 摄取率与心肌耗 O_2 量，观察 MTP 对心肌 O_2 代谢的影响。

表 22. 静注心肌肽素对狗心肌耗氧量与心肌氧利用率的影响 (给药后变化值 %)

时 间(min)	心肌耗氧量(MVO ₂)	心肌氧利用率(O_2 ext)
心肌肽素 2 mg/kg (N=8)		
2	-23.0±26	-4.00±13
5	-21.0±13***	0±8.0
10	-18.0±14	-2.00±6.0
20	-9.00±12	-2.00±12
心肌肽素 5 mg/kg (N=7)		
2	-36.0±24**	-5.00±13
5	-26.0±21**	6.00±8.0
10	-19.0±15**	6.00±6.0*
20	-8.00±10	-14.0±35
心肌肽素 10 mg/kg (N=6)		
5	-22.0±25	9.00±5***
10	-21.0±14**	2.00±5.0
20	-8.00±4.0*	3.00±4.0
30	-10.0±7.0*	-6.00±15
普萘洛尔 2 mg/kg (N=6)		
2	-31.0±13*	-3.00±1.0
5	-30.0±13***	3.00±7.0
10	-33.0±10***	3.00±8.0
30	-32.0±14***	3.00±9.0

与给药前比较: * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

5. 心肌肽素对心肌梗塞的影响

体重 20.9 ± 4.0 kg 成年健康小型猪, 雄性, 耳静脉注射 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉。气管插管接 SC-3 型电动呼吸机行人工正压呼吸。左侧第 III 肋间开胸, 暴露心脏, 分离冠状动脉前降支 (距心尖大约 1/3 位置处), 于其下穿 0* 丝线, 以备结扎; 在结扎线下心肌表面放置 20 个点的多点固定式心外膜电极, 心肌电信号经 ZYS1-I 型数控心外膜扫描仪、AB-601G 生物电放大器记录于 RM-6300 型八导生理记录仪的 RTA-1200 型热阵记录仪上, 标准电压 1mV = 1 mm, 自动定时标测 20 个点的心外膜心电图变化。股动脉插管至腹主动脉, 经 TP-400T 型压力换能器接 AP-641G 血压放大器测量平均动脉压 (MBP); 四肢皮下插入针状电极, 经 AC-601G 心电放大器测量标准 II 导联心电图 (ECG II), 并将 ECG 电讯号输入 AT-601G 心率计, 测量心率 (HR)。股静脉插管用于给药及补液。

实验分 4 组, 共用动物 25 头, 溶剂对照组在静脉输注甘露醇 120mg/kg 时, 有 5 头因室颤死亡, 存活 5 头, 其余各组每组 5 头, 经股静脉分别输注心肌肽素 5、10mg/kg, 阳性药维拉帕米 0.25mg/kg, 给药体积均为 2ml/kg, 输注速度均为 2ml/min。手术完毕待各项指标稳定后描记心外膜心电图, 随后结扎前降支, 5min 后记录心外膜心电图作为给药前对照, 然后静脉输注给药, 记录给药后 5、10、15、20、25、30、45、60、90、120、180min 的 ECG II、MBP、HR 及 20 个点的心外膜心电图 ST 段升高值, 并求得总和 (ST), 以此作为衡量心肌缺血程度的指标。将心外膜心电图 ST 段升高超过 2mV 的点定为缺血点, 计算总缺血点数 (NST), 以此作为心肌缺血范围的指标。给药后 3h 放血处死动物, 迅即取出心脏, 剪下心室, 洗净残留血液, 将结扎部位以下心室按 5mm 厚冠状切片, 室温下 1% TTC 避光染色 30min, 再将 5 片心肌正反两面的缺血区及非缺血区描记于透明胶片上, 剪取白色梗塞区胶片称重, 除以 10 面心室肌胶片重, 计算梗塞区占结扎线下心室重量的百分比。

实验分组、给药剂量及给药方式

组别	药物	输注剂量 (mg/kg)	输注速度 (ml/min)
溶剂对照组	甘露醇	120	2
受试物低剂量组	心肌肽素+甘露醇	5+120	2
受试物高剂量组	心肌肽素+甘露醇	10+120	2
阳性药物对照组	维拉帕米	0.25	2

表 23 静脉输注心肌肽素对猪心肌梗塞范围的影响

药物	剂量 (mg/kg)	动物数 (n)	梗塞范围 (%)
溶剂对照	-	5	19.4±3.02
心肌肽素	5	5	11.8±3.13*
心肌肽素	10	5	10.2±3.2**
维拉帕米	0.25	5	12.5±3.4*

注: 与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

试验证明, 心肌肽素 5、10mg/kg 可明显降低心肌梗塞猪心外膜心电图的 ST、减少 NST, 并缩小心肌梗塞范围, 对急性心肌缺血猪出现的心律失常、室颤所致死亡有一定的治疗作用, 而对血压、心率无明显影响。

实验例 3

本实验例涉及注射用心肌肽素人体耐受性、安全性研究评价。

一. 研究方法

1. 注射用心肌肽素冻干制剂单次静脉滴注试验

30 例男性健康受试者, 全面查体合格。采用随机开放的原则, 共分 5 个剂量组: 0.1mg/kg (n=2)、0.4mg/kg (n=4)、0.8mg/kg (n=8)、1.6mg/kg (n=8) 和 3.2mg/kg (n=8)。1 例进行拟定的最高剂量组试验时 (3.2mg/kg), 受试者出现颈胸部皮疹, 判断为与试验药物相关的过敏反应, 遂中止试验。按照方案的要求, 将注射用心肌肽素冻干制剂的剂量减至 2.0mg/kg 作为最高剂量组, 继续完成试验。

按试验当日晨实际体重计算给药剂量。受试者试验当天早 7 时进早餐, 8Am 开始从左上肢前臂静脉给药, 静脉滴注注射用心肌肽素冻干制剂, 滴速 3ml/min。

给药前后观察受试者的症状、血压、心率、呼吸、心电图和心电监测, 进行血常规、尿常规、血生化 and 全面体格检查。

5 2. 注射用心肌肽素冻干制剂连续静脉滴注试验

男性健康受试者 16 例, 全面查体合格。分 2 个剂量组: 1mg/kg (n=8) 和 2mg/kg (n=8)。按每日晨实际体重计算给药剂量。试验期间受试者每天早 7 时进早餐, 8Am 开始从左上肢前臂静脉给药, 静脉滴注注射用心肌肽素冻干制剂, 1 次/日, 滴速 3ml/min, 连续给药 7 天。

10 给药前后观察受试者每天的症状、血压、心率、呼吸、心电图, 第 1、3、5、7 天行 24h 心电监测, 第 3、5、8 天进行血常规、血生化 and 全面体格检查。

二. 研究结果

(一) 注射用心肌肽素冻干制剂单次给药耐受性试验

1. 30 例受试者参加试验, 平均年龄 22 ± 2 岁; 平均身高 170.8 ± 5.9 cm; 平均体重 63.6 ± 7.6 kg; 平均体重指数 21.8 ± 1.5 kg/m²。

15 30 例受试者参加 6 个剂量组的试验。分别为:

第一组: 剂量 0.1mg/kg 例数: 2 例

第二组: 剂量 0.4mg/kg 例数: 4 例

第三组: 剂量 0.8mg/kg 例数: 8 例

第四组: 剂量 1.6mg/kg 例数: 8 例

20 第五组: 剂量 2.0mg/kg 例数: 6 例

第六组: 剂量 3.2mg/kg 例数: 2 例 (1 例完成试验, 1 例中止试验)

2. 29/30 例完成各剂量试验的受试者给药后全面体格检查均未发现异常。

25 3. 给药前、给药后 5 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、2h、3h、8h、12h、24h 的血压、心率、呼吸、心电图检查, 给药前 12h 及给药后 24h 心电监测, 给药前及给药后 24h 血常规和肝肾功能、心肌酶、血脂、电解质等观察指标均在临床允许的范围内变化, 部分指标有统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但无临床意义。

4. 3/30 例受试者出现与试验药物相关的不良瓜:

4. 1 第四组 (剂量为 1.6mg/kg) 中 2/8 例出现注射部位轻度胀痛, 均未给予处理, 自行缓解。

30 4. 2 第六组 (剂量为 3.2mg/kg) 1/2 例, 药后 30 分钟 (实际给药约 90mg/计划给药 221mg), 出现头、颈、上胸部、上背部红色皮疹, 无凸起, 压之褪色, 弥漫成片, 判断为 “与试验药物极可能有关”, 立即停药。停药后 3 小时皮疹消退, 受试者无不适主诉。

(二) 注射用心肌肽素冻干制剂连续给药耐受性试验

35 1. 根据方案及结合单次给药试验结果, 16 例受试者参加并完成两个剂量组的试验。静脉滴注注射用心肌肽素冻干制剂, 1 次/日, 连续给药 7 天。

第一组: 剂量 1.0mg/kg \times 7 天 例数: 8 例

第二组: 剂量 2.0mg/kg \times 7 天 例数: 8 例

2. 药后第 3、5、8 天进行体格检查, 所有受试者均未发现异常。

40 3. 给药前后观察受试者每天的症状、血压、心率、呼吸、心电图: 第 1、3、5、7 天行 24h 心电监测; 第 3、5、8 天进行血常规、肝肾功能、心肌酶、血脂、电解质和全面体格检查。所有观察指标均在临床允许的范围内变化, 部分指标有统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但无临床意义。

45 4. 药后 3、5、8 天血生化检查时, 发现两剂量组 CK (磷酸肌酸激酶)、2.0mg/kg 剂量组 CK-MB (磷酸肌酸激酶同工酶) 比药前有明显下降 ($P < 0.01$)。两剂量组药后 LDH (乳酸脱氢酶)、LDH-1 (乳酸脱氢酶同工酶 1) 也有类似下降趋势。

5. 2.0mg/kg 剂量组中 5/8 例静脉滴注试验药物时, 曾分别出现 2-7 例次输液部位胀、酸、痛及左臂痛等与试验药物相关的不良反应症状。2 例未给予任何措施, 症状自行消失; 3 例减慢滴速后症状消失。

三. 结论

50 1. 健康男性受试者单次静脉滴注注射用心肌肽素冻干制剂, 在 0.1-2.0mg/kg 的剂量范围内耐受良好。

2. 健康男性受试者连续静脉滴注注射用心肌肽素冻干制剂, 1 次/日, 连续 7 天。1.0mg/kg 耐受性良好, 无不良反应; 2.0mg/kg 连续给药中部分受试者出现给药局部酸痛不适, 但尚可耐受, 无停药者。

3. 单次与连续给药后受试者血压、心率、呼吸等全面体格检查, 心电图、24h 心电监测, 及血尿常规、肝肾功能、心肌酶、血脂、电解质等检查指标均在临床允许的范围变化, 部分指标有统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但无临床意义。

4. 2.0mg/kg 中有 5/8 例出现给药局部酸、胀、痛感, 减慢滴速后症状可消失。提示该制剂可能对局部有刺激作用, 静脉点滴过程中注意滴速调整。

5. 连续给药的试验过程中实验室检查发现药后部分心肌酶指标呈下降趋势, 是否提示其药效作用, 须在 II 期临床试验中验证。

6. 既往有生物制品过敏者慎用此药, 但停药后症状自行消失。

实验例 4

心肌肽素初步稳定性试验

1. 注射用心肌肽素影响因素试验、加速试验的结果表明, 在去除外包装、湿度 $> 75\%$ 及温度 $> 37^{\circ}\text{C}$ 条件下外观色泽迅速变黄。水份增加, 活力降低。

2. 室温留样考察结果显示, 480~540 天时除外观色泽变为微黄色外, 其它项目无改变, 在 4°C 条件下贮存, 各考察项目无变化。表明注射用心肌肽素在湿度 $45\% \sim 90\%$ 及室温条件下至少贮存 150 天, 外观性状、含量及活力无改变, 在 4°C 条件下, 至少可贮存 480 天。

实验例 5

注射用心肌肽素质量标准

本发明为从健康幼龄猪心脏中提取的多肽类活性物质, 分子量小于 10000 道尔顿。加适量甘露醇为赋形剂, 经冷冻干燥制成无菌制品。含多肽量应为标示量的 $90.0\% \sim 110.0\%$ 。

1. 性状 本发明为类白色或微黄色冻干块状物或粉末。

2. 鉴别

(1) 取注射用心肌肽素适量, 加水制成每 1ml 中含 5mg 多肽的溶液, 加双缩脲试剂[取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.75g 与酒石酸钾钠 ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 3g, 加水约 250ml 溶解, 在搅拌下加 10% 氢氧化钠试液 150ml, 并加水稀释到 500ml, 贮存于塑料瓶中]2ml, 混匀, 即显紫色。

(2) 取注射用心肌肽素适量, 加水制成每 1ml 中含 $50 \mu\text{g}$ 多肽的溶液, 按分光光度法 (中国药典 2000 年版二部附录 A) 测定, 在 $200 \pm 2\text{nm}$ 的波长处有最大吸收。

(3) 取注射用心肌肽素适量, 加水制成每 1ml 中含 5mg 多肽的溶液, 量取 1ml, 加三氯化铁试液与氢氧化钠试液各 0.5ml, 即生成棕色沉淀, 振摇不消失, 加入过量的氢氧化钠试液, 即溶解成棕色溶液。

(4) 取注射用心肌肽素与对照品, 加流动相制成 1mg/ml 的溶液, 待完全溶解后, 用 HPLC 法测定。本品与对照品比较, 主峰 1、4、5 相对保留时间相差不超过 0.1 分钟。

3. 检查

酸度 取注射用心肌肽素适量, 每瓶各加水制成每 1ml 中含 5mg 多肽的溶液, 合并, 依法测定 (中国药典 2000 年版二部附录 H), pH 值应为 $6.0 \sim 7.0$ 。

水份 取注射用心肌肽素, 按水份测定法 (中国药典 2000 年版二部附录 M 第一法) 测定, 水份不得超过 1.5% 。

蛋白质 取注射用心肌肽素适量, 加水制成每 1ml 中含 2.5mg 多肽的溶液, 取 2ml 加 20% 鞣基水杨酸溶液 1ml, 不得产生浑浊。

溶液颜色 取注射用心肌肽素适量, 加水制成每 1ml 中含 1mg 多肽的溶液, 依法 (中国药典 2000 年版二部附录 A), 检查供试品管颜色应不得深于黄色管。

澄清度 取注射用心肌肽素适量, 加水制成每 1ml 中含 2.5mg 多肽的溶液, 依法 (中国药典 2000 年版二部附录 B) 检查, 溶液应澄清, 如显混浊, 与 1 号浊度标准液比较, 不得更浓。

分子量 按高效液相色谱法 (中国药典 2000 年版二部附录 V D) 测定, 本品的重均分子量不得大于 10000 道尔顿。

核酸 取注射用心肌肽素, 加水制成每 1ml 中含 2.5mg 多肽的溶液, 按定糖法测定, 核糖核酸含量每瓶不得大于标示量的 0.8% ; 脱氧核糖核酸含量每瓶不得大于标示量的 3% 。

无菌 取注射用心肌肽素, 加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 5mg 多肽的溶液, 依法检查 (中国生物制品规程 2000 年版一部 29 页), 应符合规定。

热原 取注射用心肌肽素，加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 5mg 多肽的溶液，依法检查（中国药典 2000 年版二部附录 D），剂量按家兔体重每 1 公斤注射 1ml，应符合规定。

过敏试验 取体重 250—350g 的豚鼠 6 只，连续三次间日腹腔注射本品（加氯化钠注射液溶解制成每 1ml 中含 2.5mg 多肽的溶液）各 0.5ml，于两周后再自静脉注射本品 1ml，观察 15 分钟，均不得出现过敏反应。如有竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕或咳嗽 3 声等现象中的两种或两种以上或有罗音、抽搐、虚脱或死亡等现象之一者，应判为阳性。

异常毒性 取本品加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 2.5mg 多肽的溶液，依法检查（中国药典 2000 年版二部附录 C），按静脉注射法给药，应符合规定。

降压物质 取注射用心肌肽素，加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 1.0mg 多肽的溶液，依法检查（中国药典 2000 年版附录 G），剂量按猫体重每 1kg 注射 0.1mg，应符合规定。

活力 取注射用心肌肽素适量，按活力测定法测定，本品的活力不得低于 2.2。

其他 应符合注射剂项下有关的各项规定（中国药典 2000 年版二部附录 I B）。

4. 含量测定

取注射用心肌肽素适量，分别加水制成每 1ml 中约含 0.1mg 多肽的溶液，按 Folin-酚法测定。

实施例 1

取 1 公斤健康乳猪心室肌洗净、切碎，加 1 公斤灭菌蒸馏水以 3000rpm/min 转速匀浆，匀浆液在 -20℃ 冷冻 24 小时，解冻后反复 3 次，隔水加热至 75℃，用型号为 XAS03-172/8 的板框滤器（购自广州医药器械研究所）过滤除渣，选用 10u 中速滤纸，得到粗滤液，粗滤液用中空纤维柱（规格为 F60，购自瑞士金宝公司）超滤，得到分子量为 12Kd 精滤液，用超滤膜（规格为 10Kd，Millipore 公司）超滤，截留分子量为 9500Da 的心肌肽素溶液 150ml，以 Millipore 公司的反渗透浓缩柱浓缩产品。

所述心肌肽素的溶液经过质量检查至符合质量标准，然后过滤除菌、灌装、再经冷冻干燥，所用设备为冷冻干燥机，20 分钟使干燥室内搁板温度达到 -20℃，再经 30 分钟，使制品温度达到 -35℃；保持 2 小时将冷凝器内温度降到 -50℃，再抽真空，真空度达到 100KPa 时，连通干燥室与冷凝器，停止干燥箱的制冷，当干燥箱的真空度为 15Pa 时开始升温，升温速度为 3℃/min，升温至 15℃，保温 3 小时，继续以 10℃/min 速度升温至 22℃，持续 5 小时；继续以 10℃/min 速度升温至 35℃，持续 2 小时；继续以 5℃/min 速度升温至 50℃，持续 1 小时。进入降温阶段，20min 内使温度降至 40℃，持续 10 小时，即得到外观合格的心肌肽素冻干品，取出制品封口。

所述心肌肽素经分析，多肽含量为 85%，游离氨基酸为 8%，核糖核酸含量 1%，脱氧核糖核酸含量 6%，重均分子量 9500 道尔顿。

实施例 2

取 1 公斤健康乳牛心室肌洗净、切碎，加 1 公斤灭菌蒸馏水以 5000rpm/min 转速匀浆，匀浆液在 -30℃ 冷冻 48 小时，解冻后反复 4 次，隔水加热至 90℃，用型号为 XAS03-172/8 的板框滤器（购自广州医药器械研究所）过滤除渣，选用 8u 中速滤纸，得到粗滤液，粗滤液用中空纤维柱（规格为 F60，购自瑞士金宝公司）超滤，得到分子量为 12Kd 精滤液，用超滤膜（规格为 5Kd，Millipore 公司）超滤，截留分子量为 5000Da 的心肌肽素溶液 150ml，以 Millipore 公司的反渗透浓缩柱浓缩产品。

所述心肌肽素的溶液经过质量检查至符合质量标准，然后过滤除菌、灌装、再经冷冻干燥，所用设备为冷冻干燥机，40 分钟使干燥室内搁板温度达到 -18℃，再经 20 分钟，使制品温度达到 -25℃；保持 1 小时将冷凝器内温度降到 -40℃，再抽真空，真空度达到 95KPa 时，连通干燥室与冷凝器，停止干燥箱的制冷，当干燥箱的真空度为 12Pa 时开始升温，升温速度为 2℃/min，升温至 10℃，保温 5 小时，继续以 16℃/min 速度升温至 25℃，持续 3 小时；继续以 15℃/min 速度升温至 30℃，持续 1 小时；继续以 8℃/min 速度升温至 60℃，持续 2 小时。进入降温阶段，30min 内使温度降至 46℃，持续 8 小时，即得到外观合格的心肌肽素冻干品，取出制品封口。

所述心肌肽素经分析，多肽含量为 78%，游离氨基酸为 15%，核糖核酸含量 2%，脱氧核糖核酸含量 5%，重均分子量 5000 道尔顿。

实施例 3

取 1 公斤健康乳兔心室肌洗净、切碎，加 1 公斤灭菌蒸馏水以 1000rpm/min 转速匀浆，匀浆液在 -10℃ 冷冻 72 小时，解冻后反复 3 次，隔水加热至 85℃，用型号为 XAS03-172/8 的板框滤器（购自广州医药器械研究所）过滤除渣，选用 5u 中速滤纸，得到粗滤液，粗滤液用中空纤维柱（规格为 F60，购自瑞士金宝公司）超滤，得到分子量为 11Kd 精滤液，用超滤膜（规格为 3Kd，

Millipore 公司)超滤,截留分子量为 2000Da 的心肌肽素溶液 150ml,以 Millipore 公司的反渗透浓缩柱浓缩产品。

所述心肌肽素的溶液经过质量检查至符合质量标准,然后过滤除菌、灌装、再经冷冻干燥,所用设备为冷冻干燥机,10 分钟使干燥室内搁板温度达到-15℃,再经 25 分钟,使制品温度达到-30℃;保持 2.5 小时将冷凝器内温度降到-45℃,再抽真空,真空度达到 90KPa 时,连通干燥室与冷凝器,停止干燥箱的制冷,当干燥箱的真空度为 10Pa 时开始升温,升温速度为 5℃/min,升温至 5℃,保温 6 小时,继续以 8℃/min 速度升温至 15℃,持续 8 小时;继续以 7℃/min 速度升温至 32℃,持续 4 小时;继续以 4℃/min 速度升温至 55℃,持续 3 小时。进入降温阶段,10min 内使温度降至 50℃,持续 15 小时,即得到外观合格的心肌肽素冻干品,取出制品封口。

所述心肌肽素经分析,多肽含量为 90%,游离氨基酸为 6%,核糖核酸含量 1%,脱氧核糖核酸含量 3%,重均分子量 2000 道尔顿。

实施例 4

同实施例 1,不同的是截留分子量为 4000Da 的心肌肽素溶液,经过质量检查至符合质量标准,然后过滤除菌、灌装、按照以下配方:

15	心肌肽素	20mg
	甘露醇	375mg
	活性炭	0.005 mg
	注射用水	加至 5ml

装瓶,置于冷冻干燥机中,按 30 分钟内使干燥室内搁板温度达到-20℃,再经 40 分钟,使制品温度达到-35℃,保持 3 小时将冷凝器内温度降到-50℃,再抽真空,真空度达到 95KPa 时,连通干燥室与冷凝器,停止干燥箱的制冷,当干燥箱的真空度为 15Pa 时开始升温,升温速度为 3℃/min,升温至 10℃,保温 4 小时。继续以 12℃/min 速度升温到 20℃,持续 5.5 小时。继续以 12℃/min 速度升温到 30℃,持续 1.5 小时。继续以 6℃/min 速度升温到 60℃,持续 2 小时。进入降温阶段,20min 内使温度降至 48℃,持续 9 小时。得到外观合格的心肌肽素冻干品,取出制品封口。

冷冻干燥得到心肌肽素含量 2.0mg/ml 成品。所述心肌肽素经分析,多肽含量为 80%,游离氨基酸为 12%,核糖核酸含量 2%,脱氧核糖核酸含量 6%,重均分子量 4000 道尔顿。

实施例 5

同实施例 1,不同的是原料采用健康乳马的心室肌,截留分子量为 8000Da 的心肌肽素溶液,所得心肌肽素经分析,多肽含量为 84.5%,游离氨基酸为 6%,核糖核酸含量 2%,脱氧核糖核酸含量 7.5%,重均分子量 8000 道尔顿。

实施例 6

同实施例 1,不同的是心肌肽素溶液中还含有海藻糖,组分配比为:心肌肽素 15mg/ml,海藻糖 200 mg/ml。

实施例 7

同实施例 1,不同的是原料采用健康猪的心室肌,心肌肽素溶液中还含有乳糖,组分配比为:心肌肽素 18mg/ml,乳糖 250 mg/ml。

实施例 8

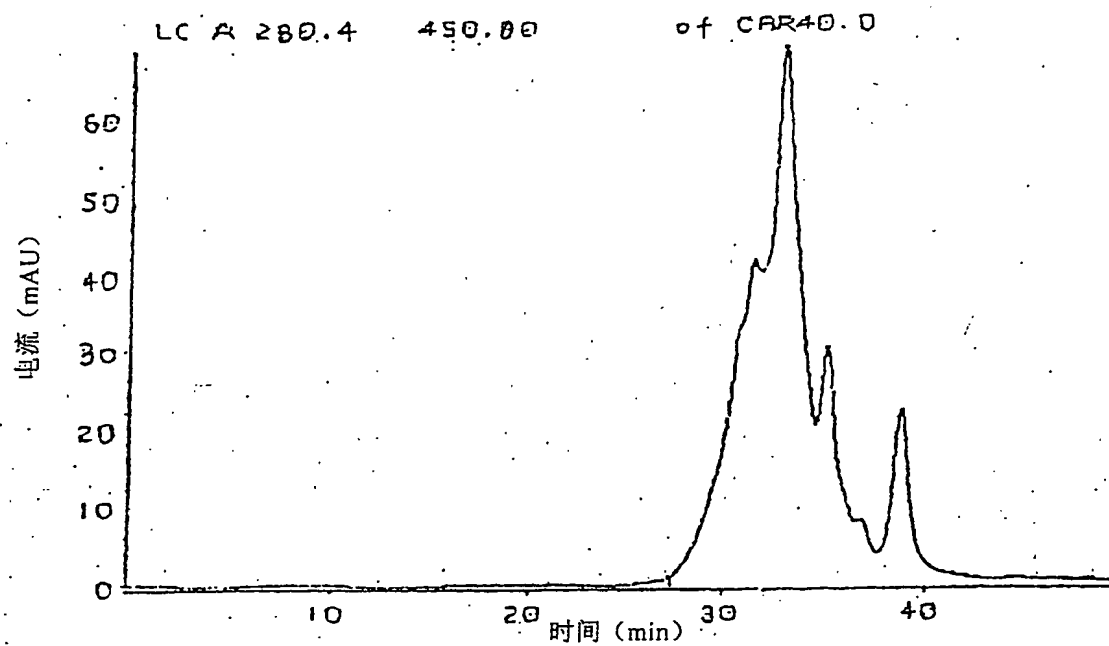
同实施例 4,不同的是截留分子量为 1000Da 的心肌肽素溶液,其中心肌肽素溶液组分为:

40	心肌肽素	16mg
	蔗糖	300mg
	活性炭	0.005 mg
	注射用水	加至 5ml

所得心肌肽素经分析,多肽含量为 82%,游离氨基酸为 12%,核糖核酸含量 2%,脱氧核糖核酸含量 4%,重均分子量 1000 道尔顿。

权利要求

1. 一种心肌肽素, 其特征在于是从不包括人的健康哺乳动物的心脏中提取的多肽, 其多肽含量为 75%~90%, 游离氨基酸为 6%~15%, 核糖核酸含量小于 2%, 脱氧核糖核酸含量小于 7.5%, 重均分子量小于 10000 道尔顿。
2. 根据权利要求 1 所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述不包括人的健康哺乳动物包括猪、牛、羊、兔、马, 优选为乳猪、乳牛、乳羊、乳兔、乳马, 最优选为乳猪。
3. 根据权利要求 1 所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素的分子量为 1000~10000 道尔顿; 优选为 2000~8000 道尔顿, 最优选的重均分子量为 2000~5000 道尔顿。
4. 根据权利要求 1~3 任何一项所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素在 pH3~8 范围内生物活性稳定, 对蛋白酶 K 敏感, 85℃ 10min 生物活性不改变, 在冷冻或冻干条件下稳定。
5. 根据权利要求 1~3 任何一项所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素等电聚焦电泳显示 2~6 条染色带; 优选等电聚焦电泳显示 2 条带, 其中 pI 为 10.92 带着色较深者。
6. 根据权利要求 1~3 任何一项所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素在紫外吸收光谱 190~210 nm 处有一稳定的最大吸收峰; 优选在紫外吸收光谱 200±2 nm 处有一最大吸收峰者。
7. 根据权利要求 1~3 任何一项所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素活力至少为 2.2。
8. 根据权利要求 1~3 任何一项所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素中还可包括赋形剂, 其重量比为: 心肌肽素: 赋形剂=15~20 : 100~375, 优选的为 18~20 : 200~375, 赋形剂可为甘露醇、海藻糖、乳糖、蔗糖或其它冻干用辅料, 优选为甘露醇。
9. 根据权利要求 8 所述的心肌肽素, 其特征在于, 还包括活性炭, 其含量为 0.05%~0.1%。
10. 根据权利要求 1~9 任何一项所述的心肌肽素, 其特征在于, 所述心肌肽素经 FPLC 分析, 主要有 5 个组份峰, 相对百分面积相加为 90%~95%。
11. 一种制备权利要求 1 所述的心肌肽素的方法, 其特征在于, 将不包括人的健康哺乳动物的心室肌洗净、切碎, 加灭菌蒸馏水匀浆, 匀浆液反复冷冻、解冻 3~4 次, 加热至 65~95℃ 过滤除渣, 用板框滤器过滤得到粗滤液, 再用中空纤维柱超滤, 得到精滤液, 用超滤膜超滤, 截留重均分子量小于 10000 Da 的心肌肽素溶液, 以反渗透浓缩柱浓缩, 最后经过滤除菌, 冷冻干燥得成品。
12. 根据权利要求 11 所述的心肌肽素的制备方法, 其特征在于, 所述灭菌蒸馏水的加入量为哺乳动物的心室肌的 0.5~4 倍; 所述匀浆的转速为 1000~5000rpm/min。
13. 根据权利要求 11 所述的心肌肽素的制备方法, 其特征在于, 所述冷冻为在低于-5℃ 的温度下冷冻 24~72 小时, 优选的为在-20℃~-30℃下冷冻 36~48 小时; 所述加热方式为采用隔水加热或直接加热, 温度为 70~90℃, 时间为不超过 2 小时, 优选的为采用隔水加热, 温度为 75℃~80℃, 时间为不超过 1 小时。
14. 根据权利要求 11 所述的心肌肽素的制备方法, 其特征在于, 所述板框滤器选用小于 10 μm 中速滤纸, 优选小于或等于 5 μm 中速滤; 用中空纤维柱超滤后得到分子量小于 12kDa 的精滤液; 用超滤膜超滤截流得到分子量小于 10kDa 的精滤液, 以反渗透浓缩柱浓缩。
15. 根据权利要求 11 所述的心肌肽素的制备方法, 其特征在于, 冷冻干燥过程为: 5~40 分钟使干燥室内搁板温度达到-15~-20℃, 优选 20~30 分钟内达到-18~-20℃, 再经 20~40 分钟, 使制品温度达到-25~-35℃, 优选 25~35 分钟内达到-30~-35℃。保持 1~3 小时将冷凝器内温度降到-40~-50℃, 再抽真空, 真空度达到 90~100kPa 时, 连通干燥室与冷凝器, 停止干燥箱的制冷, 当干燥箱的真空度为 10~15Pa 时开始升温, 升温速度为 2~5℃/min, 升温至 5~15℃, 保温 3~6 小时, 优选以 3~4℃/min 速度升温到 8~12℃, 持续 4~5 小时。继续以 8~16℃/min 速度升温至 15~25℃, 持续 3~8 小时, 优选以 10~12℃/min 速度升温到 18~22℃, 持续 4~6 小时。继续以 7~15℃/min 速度升温至 30~35℃, 持续 1~4 小时, 优选以 9~12℃/min 速度升温到 33~35℃, 持续 1.5~2 小时。继续以 4~8℃/min 速度升温至 50~60℃, 持续 1~3 小时, 优选以 5~7℃/min 速度升温到 54~58℃, 持续 1.5~2 小时。进入降温阶段, 10~30min 内使温度降至 40~50℃, 持续 8~15 小时, 优选 15~20min 内使温度降至 45~48℃, 持续 9~12 小时, 得到外观合格的心肌肽素冻干品。
16. 权利要求 1 所述的心肌肽素在制备治疗心血管疾病药物方面的用途。
17. 权利要求 1 所述的心肌肽素在制备治疗心肌缺血及再灌注损伤药物方面的用途。



LC A 280.1 450.00 of CAR40.D
DATA 6A2020

峰 (Peak)	保留时间 (Ret Time)	类型 (Type)	峰宽 (Width)	峰面积 (Area)	起始时间 (Start Time)	终止时间 (End Time)	
1	31.263	VV	1.205	4412	26.895	31.623	5165
2	32.747	VV	1.331	7448	31.623	34.463	3709
3	36.012	VV	0.955	2143	34.463	36.572	5236
4	38.731	VV	0.774	1296	37.714	41.490	975

$$y = 0.7477 - 0.07897x \quad R = -0.8937$$

图 1

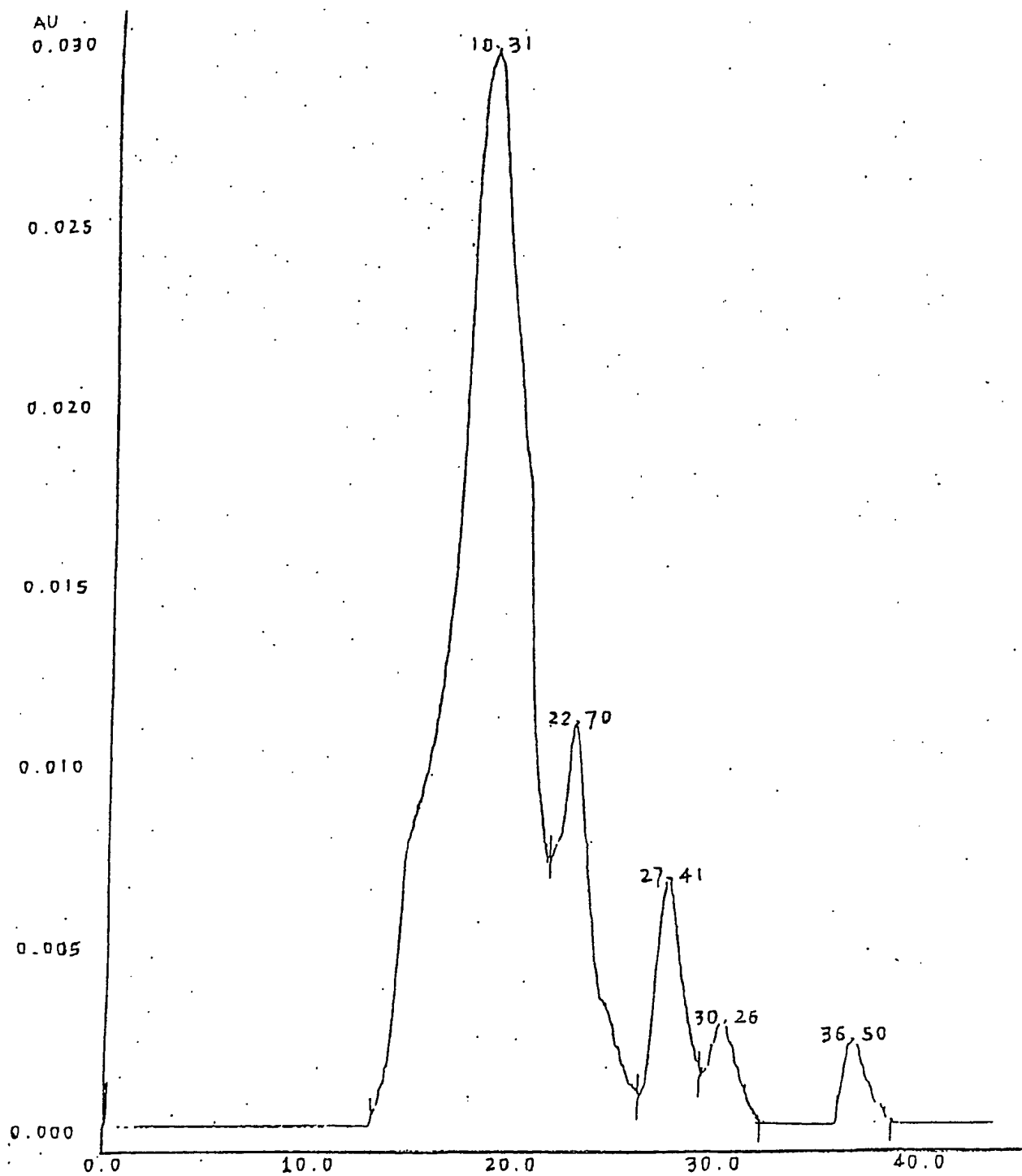


图 2

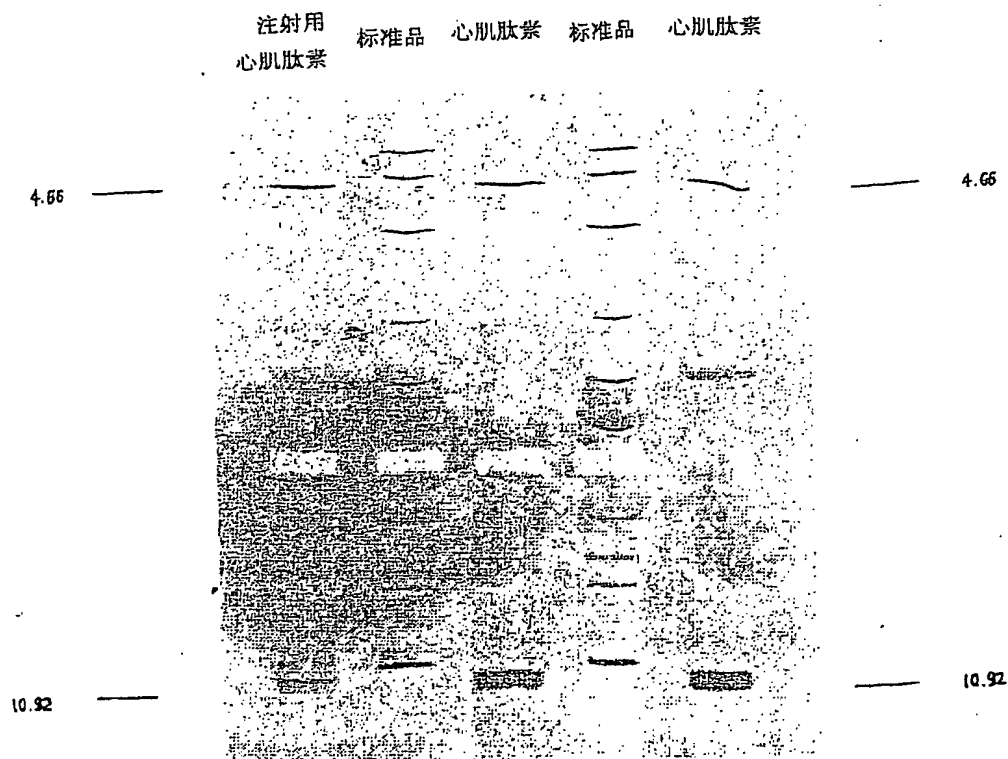
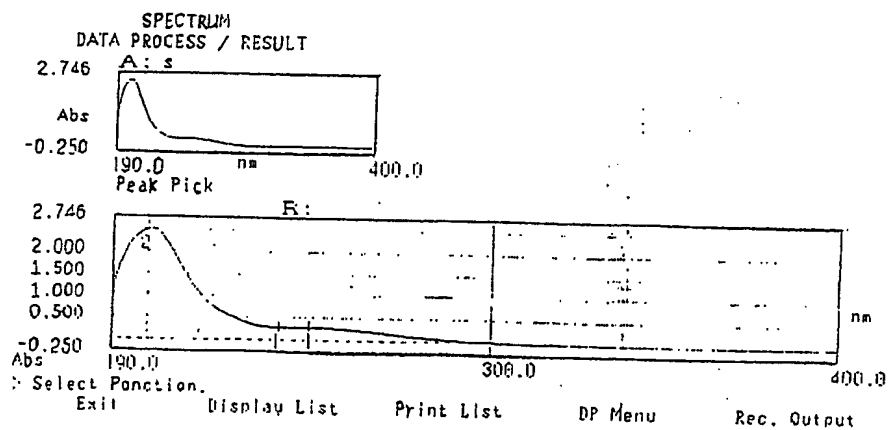
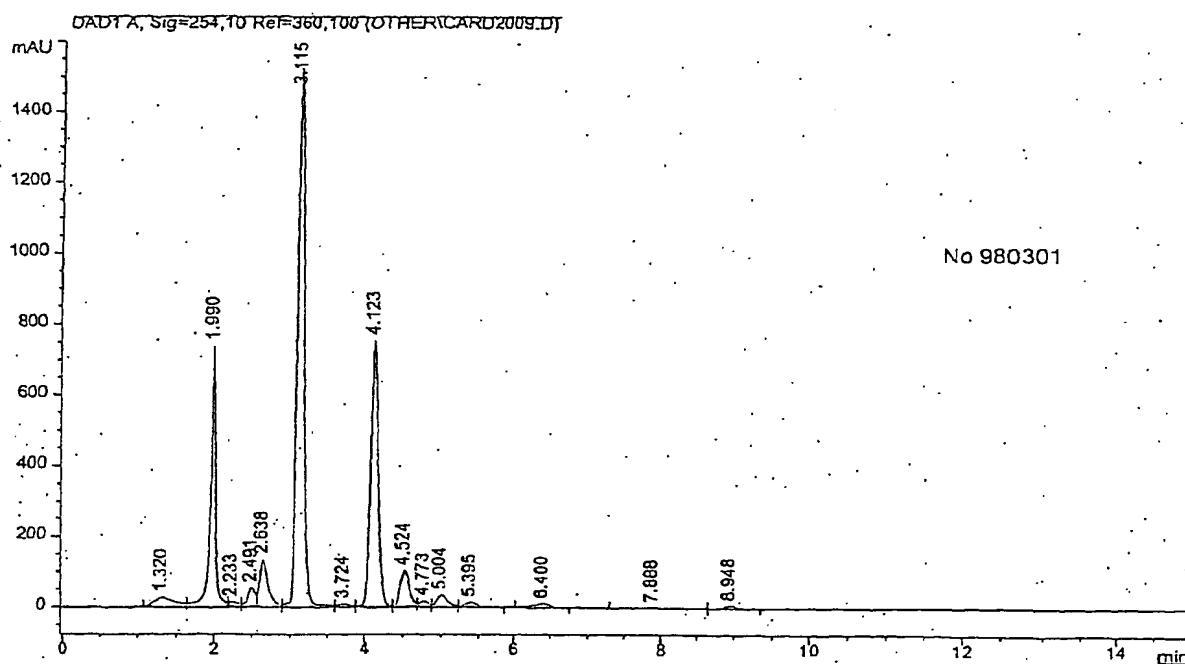


图 3



NO.	吸光度	峰	高度	吸光度	峰比	高度
	ABSCISSA	PEAK	HEIGHT	ABSCISSA	VALLEY	HEIGHT
1	247.4	0.2884	0.0239	238.8	0.2818	-0.4106
2	200.4	2.4966	1.4000			

图 4



=====
Area Percent Report
=====

分类 信号
Sorted By : Signal
Multiplier 浓缩 : 1.0000
Dilution 稀释 : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,10 Ref=360,100

峰 #	保留时间 RetTime [min]	类型 Type	峰宽 Width [min]	峰面积 Area [mAU*s]	高度 Height [mAU]	峰面积百分比 Area %
1	1.320	VV	0.2476	523.23895	28.84586	2.3415
2	1.990	VV	0.0687	3608.51245	742.13055	16.1483
3	2.233	VV	0.1214	127.18691	14.92828	0.5692
4	2.491	VV	0.1013	371.21744	55.99518	1.6612

图 5



图 6

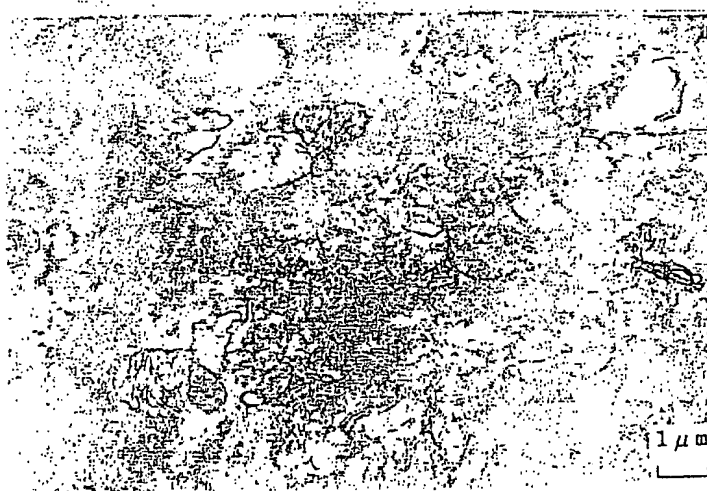


图 7



图 8



图 9



图 10



图 11



图 12

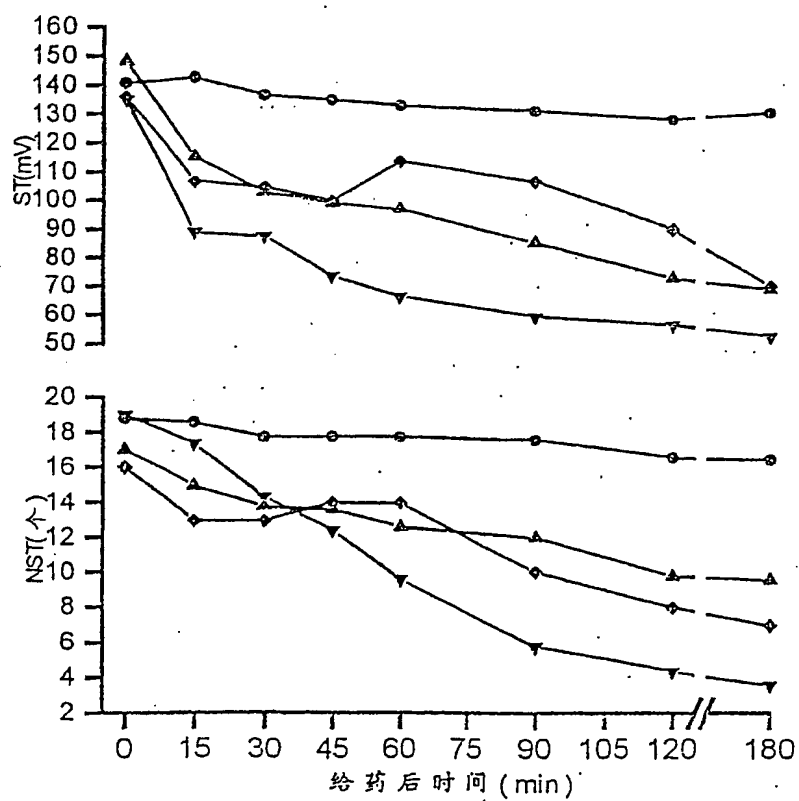


图 13

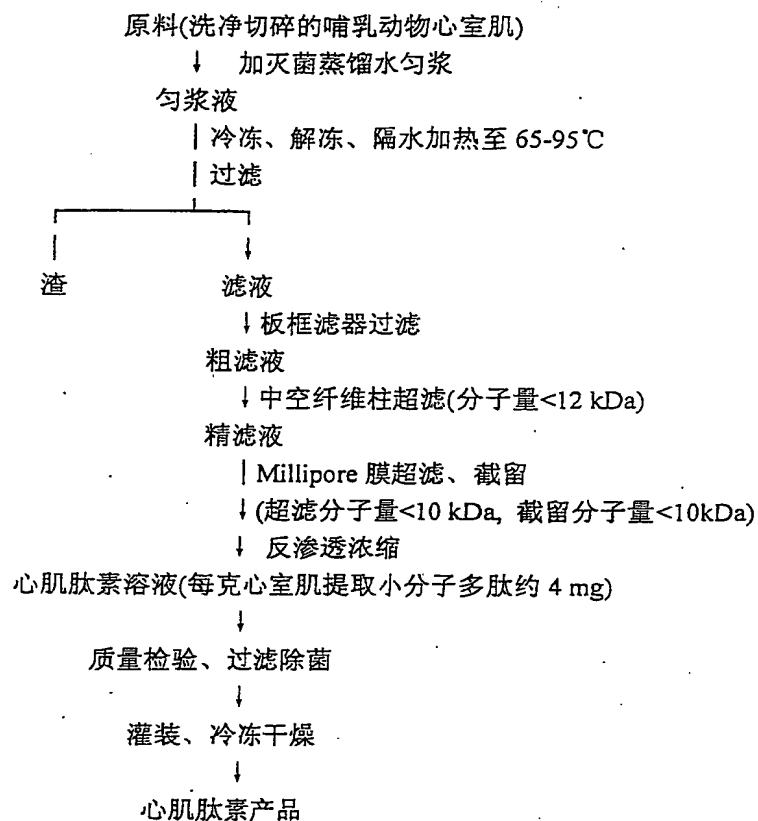


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 2/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

The published documents of Chinese patent applications and non-patent literatures

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI EPODOC PAJ BA peptide isolate myocyte cardium

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1108663A, 20.SEP. 1995, THE 458 TH HOSPITAL OF THE CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY, whole document	
A	Pharmaceutical Biotechnology, 1996, Vol. 3(2); 98-100, ZHANG Xiujian "Studies on Biochemical Characters and Effect on DNA Synthesis of Myocardial Cells of Heart Active Factor"	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17.MAY. 2004

Date of mailing of the international search report

03.JUN 2004 (03.06.2004)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No. (86-10)52085079



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000138

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-10,16-17

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 1-10 and 16-17 will not be examined because they do not meet the criteria set out in PCT Article 6. Claims 1-10 claim a cardio myopeptidin, but they do not describe the specific structure of the matter, neither do they use the production method to restrict the matter, so the matter for which protection is sought is not clearly defined, claims 1-10 and 16-17 lack clarity. The same objection applies to the claims 16-17 which relate to the uses of the matter.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:


Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN 2004/000138

A. 主题的分类 IPC ⁷ C07K 2/00 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号) C07K A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 中国专利文献 中国非专利文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI EPODOC PAJ BA 肽 分离 心肌细胞 心肌		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1108663 A 20.9 月 1995, 中国人民解放军第 458 医院, 全文	
A	药物生物技术, 1996, Vol. 3(2): 98-100 张修健等“心活素的生化性质及其对心肌细胞 DNA 合成的影响”	
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 17.5 月 2004		国际检索报告邮寄日期 03 · 6月 2004 (03 · 06 · 2004)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员  电话号码: (86-10)62085079

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN 2004/000138

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

2. ☒ 权利要求: 1-10, 16-17

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说:

权利要求 1 并没有说明要求保护的心肌素肽的具体结构, 同时也没有通过制备方法对其进行限定, 仅通过其来源和多肽含量等特征进行了描述, 但是通过这些特征本领域技术人员难以确定该权利要求的保护范围, 即权利要求 1 不清楚, 权利要求 2-10 为权利要求 1 的从属权利要求, 其附加技术特征仍然未能清楚地限定该心肌素肽, 因此, 权利要求 1-10 不符合专利合作条约第 6 条的规定。同样的缺陷还存在于权利要求 16-17。

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。